

Caso Clínico

ESTUDO DA HIPERSENSIBILIDADE A AINES E TESTE DE ATIVAÇÃO DE BASÓFILOS

Jorge Viana¹, Sofia Vale Pereira², Carlos Loureiro³, Anabela Mota Pinto⁴, Ana Todo-Bom⁵

¹Assistente de Imunoalergologia/Consultant, Immunology and Allergology, Serviço de Imunoalergologia, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

²Investigadora do Instituto de Patologia Geral/Investigator at the Institute of General Pathology, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

³Assistente Hospitalar Graduado/Graduated Consultant, Serviço de Imunoalergologia, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

⁴Professora Catedrática de Fisiopatologia/Professor of Physiopathology, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; Diretora do Instituto de Patologia Geral/Head of the Institute of General Pathology, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

⁵Diretora de Serviço/Head of the Department, Serviço de Imunoalergologia, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

RESUMO – Introdução: A alergia a anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) está frequentemente associada a reações de hipersensibilidade graves e de difícil diagnóstico. O teste de ativação de basófilos, com citometria de fluxo Flow2cast (BAT), surge como um teste *in vitro* promissor para identificação de reações de hipersensibilidade a estes fármacos mas com limitações. **Caso Clínico:** Jovem do sexo masculino, com urticária crónica desde a infância, apresentava episódios de agravamento da urticária com angioedema imediatamente após ingestão de AINEs. Último episódio ocorrera há mais de um ano após acetilsalicilato de lisina. Primeiro BAT diagnóstico com ácido acetilsalicílico (AAS) foi inconclusivo. Prova de provocação oral (PPO) com celecoxib negativa. PPO com AAS 700mg desencadeou anafilaxia às 3 horas, com hipoxémia e triptase sérica de 27.1 µg/L. Repetição de BAT demonstrou expressivo aumento da ativação basal e após incubação com AAS. **Discussão:** Este caso enquadra-se na indicação atual do BAT na hipersensibilidade a AINEs: resultados negativos não evitam PPO a AINEs. Contudo a proximidade temporal da última reação ao BAT aparenta influenciar os resultados.

PALAVRAS-CHAVE – Anti-inflamatórios não esteroides, efeitos adversos; Teste de desgranulação de basófilos; Hipersensibilidade a fármacos, diagnóstico; Urticária, complicações; Teste de provocação a fármacos.

NSAID HYPERSENSITIVITY AND BASOPHIL ACTIVATION TEST

ABSTRACT – Introduction: Allergy to nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is often associated with severe hypersensitivity reactions and with difficult diagnosis. Basophil activation test by flow cytometry with Flow2cast (BAT) is a novel *in vitro* test for identification of hypersensitivity reactions to these drugs but with some limitations. **Clinical case:** Young male manifesting chronic urticaria since childhood presented with worsening of hives with angioedema immediately after NSAID intake. Last reaction happened over a year before after lysine acetylsalicylate. Initial BAT for diagnosis with acetylsalicylic acid (ASA) was inconclusive. Drug provocation test (DPT) negative to celecoxib. Another DPT with 700mg of ASA triggered anaphylaxis three hours later with hypoxia and serum tryptase 27.1 µg / L. A second BAT had higher basal activation and marked increase with ASA incubation. **Discussion:** This case shows current BAT recommendation in NSAID hypersensitivity: a negative BAT does not avoid NSAID DPT. However, time between last reaction and BAT seems to influence results.

KEY-WORDS – Anti-inflammatory agents; Non-steroidal, adverse effects; Basophil degranulation test; Drug hypersensitivity, diagnosis; Urticaria, complications; Drug provocation test.

Caso Clínico

Conflitos de interesse: Os autores declaram não possuir conflitos de interesse.

No conflicts of interest.

Suporte financeiro: O presente trabalho não foi suportado por nenhum subsídio ou bolsa.

No sponsorship or scholarship granted.

Direito à privacidade e consentimento escrito / Privacy policy and informed consent: Os autores declaram que pediram consentimento ao doente para usar as imagens no artigo. *The authors declare that the patient gave written informed consent for the use of its photos in this article.*

Recebido/Received - Agosto/August 2014; Aceite/Accepted - Outubro/October 2014

Correspondência:

Dr. Jorge da Costa Viana,
Serviço de Imunoalergologia
Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
Av. Bissaya Barreto, Praceta Prof. Mota Pinto
3000-075 Coimbra, Portugal
Tel.: +351925145155
E-mail: Viana.jorge@gmail.com

INTRODUÇÃO

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) são fármacos com características analgésicas, antipiréticas e anti-inflamatórias e situam-se entre os 30 fármacos mais consumidos a nível mundial. Consistem numa família de fármacos heterogéneos com diferentes estruturas químicas que podem ser classificados de acordo com a intensidade de inibição da ciclo-oxigenase (COX): os inibidores seletivos de COX-2 (COXIBEs) bloqueiam a COX-2 com pouco efeito sobre a COX-1.¹

A Hipersensibilidade aos AINEs (HS-AINEs) é uma situação bem conhecida datando de 1902. A primeira descrição de hipersensibilidade a ácido acetilsalicílico (AAS) foi feita por Hirschberg. Widal² descreveu-a pela primeira vez como uma síndrome em 1922; foi universalizada por Samter e Beers³ no final dos anos 60. A síndrome inclui manifestações respiratórias típicas com quadro clínico de rinite recorrente associada a polipose nasal e a crises de asma – a tríade clássica. Contudo, podem estar presentes ou coexistir manifestações cutâneas como urticária e angioedema podendo estas relacionar-se com reações anafiláticas.

Considera-se reação adversa a medicamentos (RAM) qualquer resposta prejudicial ou indesejável, não intencional. Podem ser divididas em previsíveis ou imprevisíveis. Estas últimas incluem as reações de hipersensibilidade que constituem cerca de 1/6 das RAM e definem-se, de acordo com a *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*,⁴ por sintomas ou sinais objetivos e reprodutíveis, típicos de alergia, iniciados pela exposição a um estímulo em dose tolerada

por indivíduos normais. A HS-AINEs inclui-se nesta definição e constitui 20-25% das reações de hipersensibilidade medicamentosa, cuja classificação e estudo se esquematiza no quadro I (adaptado de Kowalski et al⁵ e de Torres et al⁶).

Na doença respiratória exacerbada pelos AINEs (DREA) e na doença cutânea exacerbada pelos AINEs (DCEA) considera-se que o mecanismo subjacente consiste na inibição da COX-1 e observa-se reatividade cruzada entre os diversos AINEs, com uma boa tolerabilidade aos inibidores seletivos da COX-2 em quase todos doentes. A urticária e angioedema induzidas por AINEs (NIUA - do inglês NSAID-induced urticaria and angioedema) envolve vários AINES mas mais raramente os COXIBEs (50% menos frequentemente que os restantes AINEs) assumindo-se que possa também dever-se à inibição da COX-1.⁷

A inibição da COX-1 reduz a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) e promove a metabolização do ácido araquidónico pela 5-lipoxigenase⁸ com geração de Cisteinil Leucotrienos (Cys-LT) nomeadamente LTC₄, LTD₄, e LTE₄. Os indivíduos suscetíveis apresentam maior número de receptores para leucotrienos e também baixos níveis constitucionais de síntese de PGE₂. Num estudo de coorte coreano,⁹ alguns marcadores genéticos de predisposição para HS-AINEs identificados relacionavam-se com aumento da síntese de receptores de Cys-LT, menor produção de PGE₂ e ainda com aumento de tromboxano A₂, que também promove produção de Cys-LT. Considera-se assim que o processamento aberrante do ácido araquidónico influencia a hiper-reatividade dos basófilos, que libertam histamina e desencadeiam a resposta inflamatória.

Caso Clínico

Já na urticária/angioedema e anafilaxia induzida por um único AINE (SNIUAA – do inglês *single NSAID-induced urticaria/angioedema and anaphylaxis*) confirmou-se a sensibilização, em alguns casos, por testes cutâneos e determinação de IgE específica nomeadamente a pirazolonas.

Atualmente, o “gold standard” no diagnóstico de HS-AINEs é a prova de provocação oral (PPO), com elevada sensibilidade e especificidade, cujo valor preditivo negativo para os AINEs ascende a mais de 96%.¹⁰ Os protocolos variam consoante o grau de suspeição e conforme o objetivo definido seja a obtenção do diagnóstico (usa-se fármaco suspeito) ou a seleção de uma alternativa terapêutica (preferem-se COXIBEs). Na presença de sintomas respiratórios desencadeados pela ingestão de AINEs ou de patologia respiratória crónica, a prova efetua-se sob controlo espirométrico seriado. Um protocolo diagnóstico preconizado é a elaboração de uma PPO com AAS em 3 dias consecutivos, iniciada com placebo e progredindo com doses fracionadas do fármaco até atingir a dose cumulativa no terceiro dia, equivalente a uma toma em dose terapêutica.

A PPO é positiva se surgirem sinais ou sintomas de hipersensibilidade. Geralmente, as reações ocorrem em 15 minutos a 1 hora após administração do fármaco. Em alguns casos podem ocorrer reações graves como a anafilaxia. As PPO realizam-se sob rigorosa vigilância por pessoal especializado com recursos adequados. Avaliam-se sinais e sintomas das vias áreas superiores e inferiores, cutâneos, gastrointestinais e sistémicos.^{10,11}

Face a estes riscos da PPO, procuram-se alternativas diagnósticas *in vitro* nomeadamente o teste de libertação de histamina e o de libertação de sulfidoleucotrienos (CAST) cujos resultados promissores ainda não são aplicáveis à rotina clínica.

Outro método é o teste de ativação de basófilos (BAT) que pode ser efetuado através de incubação de uma amostra de sangue periférico com uma solução que contém o estímulo pretendido, procedendo-se posteriormente à análise das populações de basófilos ativados, recorrendo à técnica de citometria de fluxo *Flow2cast*. Nesta técnica, a seleção de basófilos realiza-se através da expressão do recetor de IL-3R (CCR3), o que é mais adequado para hipersensibilidade não mediada por IgE, como na HS-AINEs. A contagem de basófilos ativados recorre à expressão do marcador de superfície CD63. Os resultados são fornecidos comparando as leituras no citómetro antes e após incubação com o alérgeno em estudo. Este marcador existe em baixa concentração na superfície dos basófilos em repouso mas a sua expressão aumenta com a fusão da membrana dos grânulos

citoplasmáticos (onde se encontram mais concentrados) à membrana citoplasmática.¹²

CASO CLÍNICO

Descreve-se caso clínico de adulto do sexo masculino de 27 anos de idade com urticária crónica desde a infância e que identificava a sudorese como principal fator de agravamento.

Referia períodos de agudização de urticária, por vezes acompanhada de angioedema periocular, sem outros sintomas. Algumas vezes o doente correlacionava os sintomas cutâneos mais exuberantes com toma de paracetamol, ibuprofeno ou acetilsalicilato de lisina. Nestas situações referia agravamento nos primeiros 30 minutos que se seguiam à sua ingestão. O último episódio ocorrera mais de um ano antes do estudo.

Recorreu à consulta de Imunoalergologia para clarificação de desencadeantes e orientação terapêutica. Com esse objetivo foi feita colheita de sangue para teste de ativação de basófilos com ácido acetilsalicílico. O sangue do doente foi incubado e estimulado de acordo com o protocolo, testando 3 concentrações do fármaco (2,5mg/ml, 1 mg/ml e 0,25mg/ml) e, após análise da percentagem de basófilos ativados (CD63+) por citometria de fluxo encontrámos, para a concentração de 2,5mg/ml, um aumento em 7,85% de basófilos ativados que expressavam a molécula de ativação CD63. Não foram evidentes as alterações ocorridas no decurso da ativação, estando, no entanto, descrito na literatura que um teste BAT pode ser considerado positivo se existir uma percentagem de basófilos ativados superior a 5%.

Realizou a seguir uma primeira PPO alternativa a celecoxib que foi negativa, o que motivou a realização de PPO diagnóstica com ácido acetilsalicílico. Seguiu-se o protocolo para AINEs com administração progressiva de doses sob vigilância, com medidas de segurança preconizadas e após consentimento informado, conforme orientações EAACI/Ga2len.¹¹

À terceira hora após dose cumulativa de 700mg iniciou quadro de urticária generalizada com angioedema peri-ocular, vômitos e opressão torácica com ligeiro aumento do tempo expiratório e gasometria com hipoxemia (insuficiência respiratória tipo I). A triptase colhida nesse momento foi de 25,1ug/L. Reverteu rapidamente o quadro clínico após administração de adrenalina intramuscular. Fez ainda terapêutica com metilprednisolona intravenosa e clemastina intramuscular, mantendo-se sob vigilância em internamento por 24 horas.

Colheu-se nova amostra sanguínea no decurso da

Caso Clínico

Tabela 1 - Classificação e estudo de hipersensibilidade a AINEs (adaptado de Kowalski et al⁵ e de Torres et al⁶).

REAÇÕES A AINES	REAÇÕES AGUDAS <24H (Habitualmente 1-2h)				REAÇÕES TARDIAS (>24h)
Padrão de reação	Broncospasmo Dispneia Rinorreia e obstrução nasal	Urticária Angioedema Choque anafilático			Erupções maculopapulares: • Erupção fixa a fármaco • Dermatite de contacto • Reações de fotossensibilidade • Stevens-Johnson/necrólise epidérmica tóxica • Pustulose generalizada exantemática aguda • Síndrome de hipersensibilidade induzida por fármaco • Nefrites, pneumonites, meningites assépticas,...
Doença subjacente	Asma brônquica Rinossinusite Polipose nasal	Urticária Angio-edema	Sem doença crónica	Sem doença crónica (frequente atopia, alergia alimentar ou a outros fármacos)	Sem doença crónica
Reatividade a outros AINES	Reação cruzada	Reação cruzada	Múltiplos, COXIBEs menos envolvidos	Ausente	Ausente
Classificação	Doença respiratória exacerbada por AINEs (DREA)	Doença cutânea exacerbada por AINEs (DCEA)	Urticária/Angioedema induzidos por AINEs (NIUA)	Urticária/Angioedema (ou anafilaxia) induzida por um único AINE (SNIUAA)	Reação tardia induzida por um único AINE
Mecanismo proposto	Inibição variável de COX-1 e aumento de Cisteinil Leucotrienos (Cys-LT)			IgE-mediado	Mecanismos celulares (Linfócitos T, linf. T citotóxicos, NK,...)
Testes	Testes cutâneos não recomendados			Prick e intra-dérmicos ao AINE suspeito; IgE específica não validada	Epicutâneos ou intra-dérmicos de leitura tardia (>48h) ao AINE suspeito
	BAT, CAST ELISA com AINE suspeito - não validados				Teste de transformação de linfócitos - não validado

[DREA – doença respiratória exacerbada por AINEs; DCEA – doença respiratória exacerbada por AINEs; NIUA – do inglês NSAID-induced urticaria and angioedema; SNIUAA – do inglês single NSAID-induced urticaria/angioedema and anaphylaxis; COX – ciclo-oxigenase; COXIBEs - anti-inflamatórios não esteróides inibidores seletivos da ciclo-oxigenase 2; NK – Natural killers; BAT – teste de ativação de basófilos Flow2Cast; CAST ELISA – do inglês cellular allergen stimulation test enzyme-linked immunosorbent assay]

PPO para a determinação do teste de ativação de basófilos (BAT). O estudo desta amostra prévio à incubação (*Patient background*), habitualmente sem alterações, demonstrou neste doente uma ativação marcada dos basófilos (Fig. 1) que ainda aumentou nas várias concentrações do fármaco testadas (2,5 mg/ml, 1 mg/ml e 0,25mg/ml) para um valor de 96,13% de basófilos ativados na concentração de 1mg/ml (Fig. 2). De referir que o *Patient background* obtido foi de 93,9% de basófilos ativados (Fig. 1) na colheita de sangue realizada durante a prova de provocação vs 3,97% encontrados

no estudo basal fora da exposição próxima ao fármaco, para a mesma condição.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O AAS é o AINEs mais prescrito, com ação analgésica moderada, antipirética e anti-inflamatória, sendo o mais associado a reações de hipersensibilidade. Na população geral, a prevalência de HS-AINEs situa-se nos 0,6-5,7%, mas aumenta para 4,3-20% nos doentes

Caso Clínico

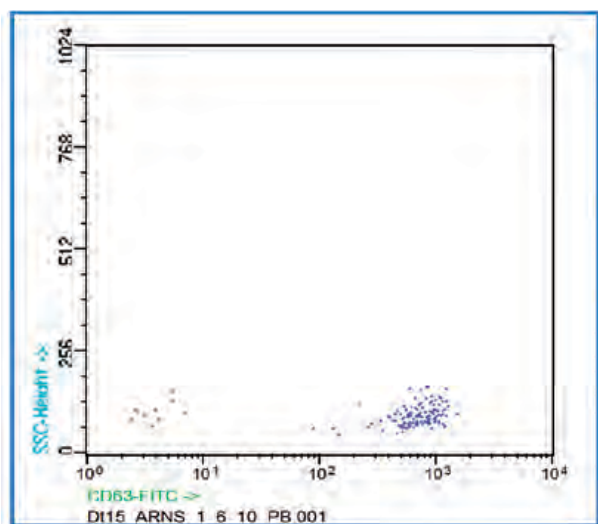


Fig 1 - BAT - "Patient-background" após PPO.

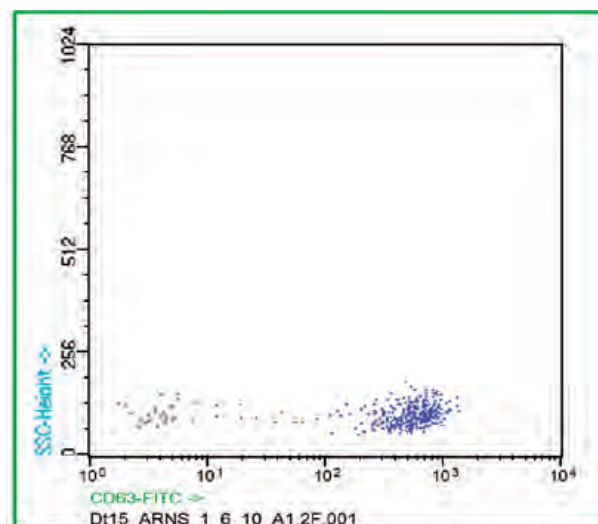


Fig 2 - BAT após PPO: estimulação com AAS.

asmáticos e para 33% em asmáticos com rinossinusite crónica e polipose nasal. Na urticária crónica, a prevalência é de 10-30% com $\frac{3}{4}$ com reatividade cruzada a outros AINEs.⁵

A clínica de reação a múltiplos AINEs é pouco sugestiva de mecanismo mediado por IgE pelo que os testes cutâneos e a pesquisa de IgE específica não se preconizam.¹³

Nestes doentes há necessidade de confirmar diagnóstico e alternativas seguras. A apresentação habitual é mais tardia (3ª-4ª década) e estudos prévios sugerem que a HS-AINEs varia ao longo da vida com relatos de provocações negativas após reações positivas prévias.¹⁴ Assim, no presente caso, face a quadro clínico de intervalo desde última exposição superior a um ano, sempre limitada a atingimento cutâneo na presença de urticária crónica e com PPO a celecoxib negativa, optou-se pela realização de PPO diagnóstica com AAS.

O resultado, neste caso positivo, da PPO permitiu confirmar a presença de HS-AINEs com tolerância a inibidor seletivo da COX-2.

O quadro clínico é sugestivo de DCEA. Contudo, na provocação com AAS - forte inibidor da COX-1 - observou-se também broncospasmo e queixas gastrointestinais. Estas situações "blended" na HS-AINEs já foram relatadas na literatura, podendo decorrer de susceptibilidades diferentes de cada órgão, variáveis entre indivíduos.¹⁵ Face ao incremento da triptase sérica, não será de excluir uma possível sensibilização mediada por IgE a AAS.¹³

A BAT inicial inconclusiva com os critérios de positividade considerados não evitou a PPO neste caso.

Apesar da evolução técnica do BAT, ainda não é possível implementar eficaz e rapidamente este exame na rotina clínica por dificuldades técnicas na padronização deste exame, nomeadamente metodologia de colheita e armazenamento de sangue, tipo de amostra celular e marcadores de ativação e identificação utilizados.¹⁶ A futura harmonização e padronização de protocolos poderão obviar estas limitações. Misumi tentou padronizar o BAT para AAS obtendo: sensibilidade 84%, especificidade 34,6% e valor preditivo positivo 61,4%. De Weck *et al*¹⁷ demonstraram resultados positivos no BAT que permitem evitar PPO, reafirmando que resultados negativos não excluem a necessidade de esclarecimento diagnóstico por PPO.

É relevante que a reavaliação por BAT, realizada no decurso da PPO e enquanto surgiam sintomas, tenha demonstrado ativação basal intensa mantendo ainda alguma resposta adicional expressiva com a incubação. Misumi observou que a sensibilidade era superior nos doentes cuja reação ocorrera há menos de um ano (93,7%), comparando com 84,4% do global.¹⁸ Neste caso clínico, a observação dos fatos sugere que a reexposição ao AINE tenha induzido aumento da sensibilidade dos basófilos à desgranulação. Tal como noutros processos de estudo de alergia IgE-mediada a fármacos, questiona-se se existirá influência temporal da colheita de sangue no resultado do BAT, cujo esclarecimento requer estudo seriado por BAT ao longo do tempo em cada doente consoante a exposição a AINEs. Essa influência no BAT também foi descrita na SNIUAA.^{19,20} Igualmente interessante seria esclarecer a expressão de Cys-LT,

Caso Clínico

seus recetores e outros mediadores envolvidos nestas patologias.

O teste de ativação de basófilos com avaliação por *Flow2Cast* apresenta-se como um método diagnóstico *in vitro* promissor, dirigido a alergénios medicamentosos, inclusive para mecanismos não mediados por IgE. Como é um método celular, replica bem as vias presentes *in vivo* que originam o quadro de hipersensibilidade. É no entanto fundamental sensibilizar a população geral e agentes de saúde para o estudo precoce das reações sistémicas.

REFERÊNCIAS

1. Szczeklik A, Sanak M. The broken balance in aspirin hypersensitivity. *Eur J Pharmacol.* 2006; 533 (1-3):145-55.
2. Widal F, Abrami P, Lermoyez J. Anaphylaxie et idiosyncrasie. 1992 [Anaphylaxis and idiosyncrasy. 1992]. *Allergy Proceedings.* 1993; 14-5:373-6.
3. Samter M, Beers RF. Concerning the nature of intolerance to aspirin. *Journal of Allergy.* 1997; 40 (5):281-93.
4. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy.* 2001; 56(9):813-24.
5. Kowalski ML, Asero R, Bavbek S, Blanca M, Blanca-Lopez N, Bochenek G, et al. Classification and practical approach to the diagnosis and management of hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Allergy.* 2013; 68:1228.
6. Torres MJ, Barrionuevo E, Kowalski M, Blanca M. Hypersensitivity Reactions to Nonsteroidal Antinflammatory Drugs. *Immunol Allergy Clin N Am.* 2014; 34: 507-24.
7. Mastalerz L, Setkowicz M, Sanak M, Szczeklik A. Hypersensitivity to aspirin: Common eicosanoid alterations in urticaria and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2004; 113(4):771-5.
8. Szczeklik A, Gryglewski RJ, Czerniawska-Mysik G. Relationship of inhibition of prostaglandin biosynthesis by analgesics to asthma attacks in aspirin-sensitive patients. *Br Med J.* 1975; 1(5949):67-9.
9. Kim SH, Park HS. Genetic Markers for Differentiating Aspirin-Hypersensitivity. *Yonsei Med J.* 2006; 47(1):15-21.
10. Chiriac AM, Demoly P. Drug provocation tests: update and novel approaches. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2013; 9(1):12.
11. Aberer W, Bircher A, Romano A, Blanca M, Campi P, Fernandez J, et al. Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations. *Allergy.* 2003; 58(9):854-63.
12. Sanz ML, Gamboa PM, Mayorga C. Basophil activation tests in the evaluation of immediate drug hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2009; 9(4):298-304.
13. Brockow K, Garvey LH, Aberer W, Atanaskovic-Markovic M, Barbaud A, Bilo MB, et al. Skin test concentrations for systemically administered drugs - an ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group position paper. *Allergy.* 2013; 68(6):702-12.
14. Rosado A, Vives R, González R, Rodríguez J. Can NSAIDs intolerance disappear? A study of three cases. *Allergy.* 2003; 58(7):689-90.
15. Kowalski ML, Makowska JS, Blanca M, Bavbek S, Bochenek G, Bousquet J, et al. Hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) - classification, diagnosis and management: review of the EAACI/ENDA(®) and GA2LEN/HANNA*. *Allergy.* 2011. 66(7):818-29.
16. Mayorga C1, Sanz ML, Gamboa PM, García BE, Caballero MT, García JM et al. In vitro diagnosis of immediate allergic reactions to drugs: an update. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2010; 20(2):103-9.
17. De Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Blanca M, Correia S, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity syndrome. A multicenter study. I. Clinical findings and in vitro diagnosis. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2009; 19 (5):355-69.
18. Misumi DS. Validação do Teste de ativação de basófilos no diagnóstico de reações de hipersensibilidade a anti-inflamatórios não esteroidais [online]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2013. Dissertação de Mestrado em Alergia e Imunopatologia. [consultado 2014-08-02]. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5146/tde-24062013-152145/>>.
19. Gamboa PM, Sanz ML, Caballero MR, Antepara I, Urrutia I, Jauregui I et al. Use of CD63 expression as a marker of in vitro basophil activation and leukotriene determination in metamizol allergic patients. *Allergy.* 2003; 58:312-7.
20. Gomez E, Blanca-Lopez N, Torres MJ, Requena G, Rondon C, Canto G et al. Immunoglobulin E-mediated immediate allergic reactions to dipyrone: Value of basophil activation test in the identification of patients. *Clin Exp Allergy.* 2009; 39:1217-24.